

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-513740

(43) 公表日 平成11年(1999)11月24日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 0 8 F 220/56

C 0 8 F 220/56

C 0 8 L 33/26

C 0 8 L 33/26

G 0 1 N 21/80

G 0 1 N 21/80

31/22

1 2 3

31/22

1 2 3

33/52

33/52

C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-516243
(86) (22) 出願日 平成8年(1996)10月11日
(85) 翻訳文提出日 平成10年(1998)4月20日
(86) 国際出願番号 P C T / E P 9 6 / 0 4 4 2 6
(87) 国際公開番号 W O 9 7 / 1 5 8 3 2
(87) 国際公開日 平成9年(1997)5月1日
(31) 優先権主張番号 2 9 9 5 / 9 5
(32) 優先日 1995年10月23日
(33) 優先権主張国 スイス (CH)

(71) 出願人 ノバルティス・アクチエンゲゼルシャフト
スイス、ツェーハー-4058バーゼル、シュ
バルツバルトアレー215番
(72) 発明者 パーナード、ステューブン・マーク
アメリカ合衆国02181マサチューセッツ州
ウェルズリー、ワシントン・ストリート
312番、アパートメント1、ビルディング
3
(72) 発明者 ベルガー、ヨーゼフ
スイス、ツェーハー-4132ムテンツ、パー
ンホフシュトラッセ36番
(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外2名)

最終頁に続く

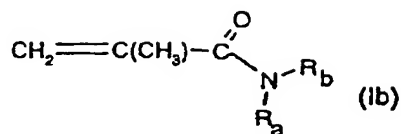
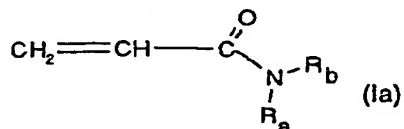
(54) 【発明の名称】 イオン強度非依存性のpH値測定光センサーシステム

(57) 【要約】

本発明は、pH感受性蛍光色素を含有するポリマー組成物、透明支持体上に膜の形で組成物を含有するイオン強度非依存性pH値測定光センサー、およびまた試験溶液のイオン強度とは非依存的に非常に正確なpH値が測定できる蛍光法による光学的方法に関する。この方法は、特に生理的溶液のpH値の測定、特に血液のpH値測定に適している。

【特許請求の範囲】

1. a) 39.9～60重量%のN,N-ジメチルアクリルアミドまたはN,N-ジメチルメタクリルアミド；
 b) 60～39.9重量%の式IaまたはIb



[式中、R_aは水素またはC₁～C₆アルキルであり、R_bはC₁～C₁₂アルキルである]

で示されるモノマー；

- c) ポリマーと混合されているか、または共有結合している0.1～0.7重量%のプロトン感受性発蛍光団；および
 d) 0～20重量%のジオレフィン性架橋成分〔a)～d)の重量%の合計は100%である〕からなる水不溶性コポリマー。

2. N,N-ジメチルアクリルアミドをモノマーa)として使用する、請求項1に記載の水不溶性コポリマー。

3. R_aは水素であり、R_bは分枝C₃～C₈アルキルである、請求項1に記載の水不溶性コポリマー。

4. R_aは水素であり、R_bはtert-ブチルであり、モノマーa)のモノマーb)に対する比が50重量部対50重量部である、請求項3に記載の水不溶性コポリマー。

5. R_aはメチルまたはエチルであり、R_bは直鎖C₃～C₈アルキルである、請求項1に記載の水不溶性コポリマー。

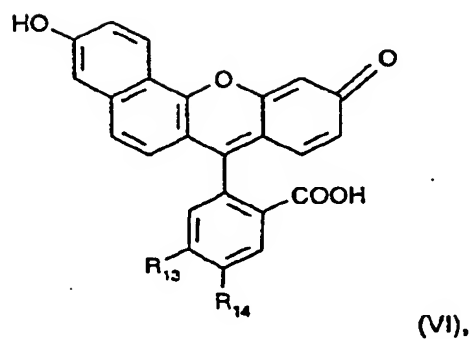
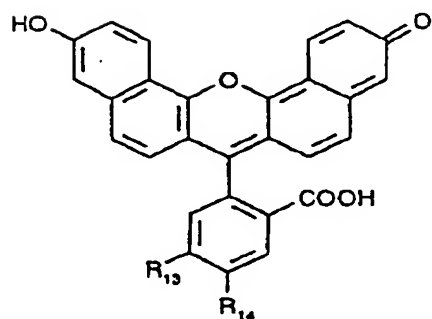
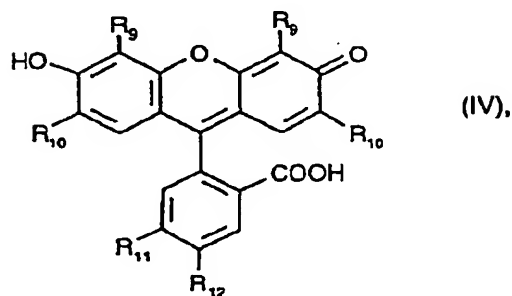
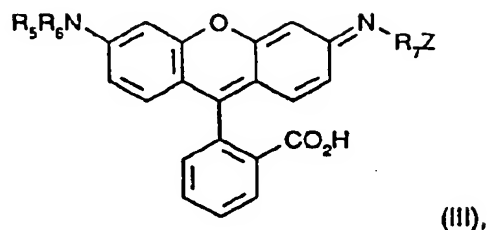
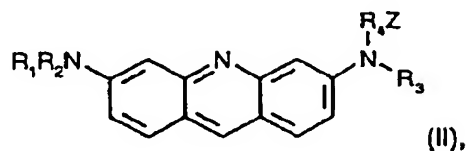
6. R_aはメチルであり、R_bはn-ブチルである、請求項5に記載の水不溶性コポリマー。

7. プロトン感受性発蛍光団を、アクリジン、アクリドン、ローダミン、キサンテン、ピレンおよびクマリンからなる群から選択する、請求項1に記載の水不

溶性コポリマー。

8. 発蛍光団がポリマーに共有結合している、請求項1に記載の水不溶性コポリマー。

9. 発蛍光団が式II、III、IV、VまたはVI



【式中、

R_1 、 R_2 、 R_5 および R_6 は、各々独立して、水素、 $-SO_2-(C_1-C_6)$ アルキルフェニル、 C_1-C_{30} アルキル、 C_1-C_{30} アルキル-CO-または式 $-(C_nH_{2n}-O)-$ ・- R_8 で示される基であり；

R_3 は水素または $-SO_2-(C_1-C_6)$ アルキルフェニルであり；

R_4 および R_7 は C_1-C_{30} アルキレンまたは式 $-(C_nH_{2n}-O)-$ ・- R_8 で示される基であり；

Z は二価の基 $-NH-CO-$ であり；

R_8 は直接の結合または C_1-C_{12} アルキレンであり；

n は2～6までの整数であり、 m は1～10までの整数であり、ただし、全炭素原子数は30以下である；

R_9 および R_{10} は、各々独立して、H、 C_1-C_4 アルキル、 C_1-C_4 アルコキシ、 C_1-C_4 アルコシールカルボニル、 C_1-C_4 アルキル- SO_2 -またはハロゲンであるか、または

R_{11} はHであり、 R_{12} は二価の基-NH-CO-、-CO-NH-(C_2-C_{12} アルキレン-O)-CO-、-CO-NH-(C_2-C_{12} アルキレン-NH)-CO-または-C(O)-NH-(CH_2CH_2-O)₁₋₆-CH₂C(O)-NH-であるか、または R_{11} は二価の基-NH-CO-、-CO-NH-(C_2-C_{12} アルキレン-O)-CO-、-CO-NH-(C_2-C_{12} アルキレン-NH)-CO-または-C(O)-NH-(CH_2CH_2-O)₁₋₆-CH₂C(O)-NH-であり、 R_{12} はHであり；または、

R_{13} はHであり、 R_{14} は二価の基-NH-C(O)-、-CO-NH-(C_2-C_{12} アルキレン-O)-CO-、-CO-NH-(C_2-C_{12} アルキレン-NH)-CO-または-C(O)-NH-(CH_2CH_2-O)₁₋₆-CH₂C(O)-NH-であるか、または R_{13} は二価の基-NH-C(O)-、-CO-NH-(C_2-C_{12} アルキレン-O)-CO-、-CO-NH-(C_2-C_{12} アルキレン-NH)-CO-または-C(O)-NH-(CH_2CH_2-O)₁₋₆-CH₂C(O)-NH-であり、および R_{14} はH（ただし、-COOH基は各々遊離形または塩の形である）またはその C_1-C_{20} アルキルエステルである]

で示される化合物である、請求項1に記載の水不溶性コポリマー。

10. 式IIの発蛍光団の R_1 および R_2 は、各々独立して、水素または直鎖 $C_{12}-C_{24}$ アルキルである、請求項9に記載の水不溶性コポリマー。

11. 式IIの発蛍光団の R_4 は直鎖 C_2-C_{16} アルキレンまたは式-(C_2H_4-O)_n- R_8 （式中、 R_8 および m は請求項9に定義した通りである）で示される基である、請求項9に記載の水不溶性コポリマー。

12. 式IIIの発蛍光団の R_5 および R_6 は、各々独立して、直鎖 C_2-C_{12} アル

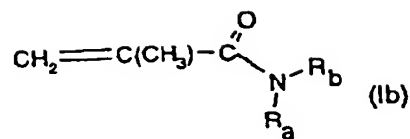
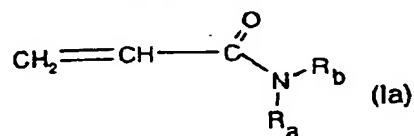
キルである、請求項9に記載の水不溶性コポリマー。

13. A) 透明支持体

B) 水不溶性コポリマーの層 [これは

a) 39.9～60重量%のN,N-ジメチルアクリルアミドまたはN,N-ジメチルメタクリルアミド；

b) 60～39.9重量%の式IaまたはIb



[式中、R_aは水素またはC₁～C₆アルキルであり、R_bはC₁～C₁₂アルキルである]

で示されるモノマー；

c) ポリマーと混合されているか、または共有結合している0.1～0.7重量%のプロトン感受性発蛍光団；および

d) 0～20重量%のジオレフィン性架橋成分〔a)～d)の重量%の合計は100%である〕からなるイオン強度非依存性pH値測定用の光センサー。

14. 発蛍光団を、アクリジン、アクリドン、ローダミン、キサンテンおよびベンゾキサンテン、ピレン、クマリンおよびフルオレセインからなる群から選択する、請求項13に記載のセンサー。

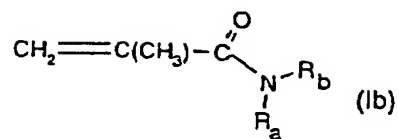
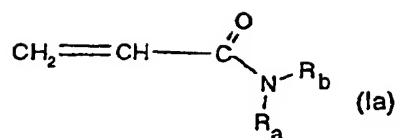
15. ポリマー層B)の厚さが0.1～500μmである、請求項13に記載のセンサー。

16. A) 透明支持体

B) 水不溶性コポリマーの層 [これは

a) 39.9～60重量%のN,N-ジメチルアクリルアミドまたはN,N-ジメチルメタクリルアミド；

b) 60～39.9重量%の式IaまたはIb



〔式中、 R_a は水素または C_1-C_6 アルキルであり、 R_b は C_1-C_{12} アルキルである〕

で示されるモノマー；

c) ポリマーと混合されているか、または共有結合している0.1～0.7重量%のプロトン感受性発蛍光団；および

d) 0～20重量%のジオレフィン性架橋成分〔a)～d)の重量%の合計は100%である〕からなる光センサーを水性試験試料と接触させ、励起光で照射し、蛍光を測定し、検量線を利用して測定蛍光強度からpH値を計算する、蛍光法による水性試料のイオン強度非依存性、可逆光学pH値測定法。

17. 試験溶液のpHが6.5～8.5である、請求項16に記載の方法。

18. 試験溶液のイオン強度が0.05～5モル/lである、請求項16に記載の方法。

19. イオン強度は実質的に1,1-または1,2-塩により与えられる、請求項16に記載の方法。

20. 試験溶液は部分的または全体的に体液からなる、請求項16に記載の方法。

21. 蛍光法による水性試験溶液のイオン強度非依存性pH値測定のための、請求項13に記載の光センサーの使用。

【発明の詳細な説明】

イオン強度非依存性のpH値測定光センサーシステム

本発明は、pH感受性蛍光色素を含有するポリマー組成物、透明支持体上に膜の形で組成物を含有するイオン強度非依存性pH値測定光センサー、およびまた試験溶液のイオン強度とは非依存的に非常に正確なpH値が測定できる蛍光法による光学的方法に関する。本法は、特に生理的溶液のpH値の測定、特に血液のpH値測定に適している。

指示薬のpK_a値は溶液のイオン強度と共に変化し、その変化は指示薬の荷電の程度に依存することが知られている。例えば、既知の試験溶液で該センサーの検量線を作成した後、異なるイオン強度依存性を有する2つのセンサー（その中、1つは可能な限りイオン強度依存性が低い）の測定値間の差からコンピュータでイオン強度とpH値を測定することがDE-A-3 430 935ですでに提案されている。該明細書に記載のほとんどイオン強度に依存しないセンサーは、正確には生理的pH範囲内にはなく、分解能が低い。これらのセンサーはポリマーマトリックスに埋め込まずに構築され、その結果、色素が直接試験溶液に接触するという不利な点がある。センサーの蛍光色素（各場合共、同じである）は、架橋基によりガラス支持体の表面上に直接固定されており、一方のセンサーは、高い極性およびイオン強度依存性を得るために追加的電荷を有し、他方のセンサーは実質的に無極性で疎水性でイオン強度非依存性となるように調整されている。これらのセンサーの極めて大きな欠点は、蛍光色素が試験溶液の外部の影響に直接さらされ、物理的影響（例えば、色素の溶解、表面での析出）および化学的影響（色素の分解）の両方によりセンサーがすぐに使用不可能になることである。さらに、エバネセント域における励起に際して、エバネセント測定域と試料の蛍光発光との干渉を完全に避けることができず、これにより測定の正確さが低減する。一方、表面に結合している蛍光色素は直ちに試験溶液と接触するようになるから、これらのセンサーの応答時間は短い。感度は十分であると考えられる。

試験溶液のイオン強度に異なった応答をする2つのセンサーを用いた光学的pH測定法は、装置が高価であり、続いて余分の計算段階が必要である。

今回、極めて特異的なコポリマーであるアクリルアミドおよびメタクリルアミドを選択し、狭い濃度範囲の蛍光色素(これはポリマーマトリックスに埋め込まれている)を選択して組み合わせることにより、生理的pH範囲である6.5~8.2においてイオン強度非依存的に非常に正確な光学的pH測定が可能となる光pHセンサーを製造することが可能であることが見出された。これにより、イオン強度を除外するための第2の測定および計算段階が省略される。pH値測定が高精度であることは、特にヒト血液の分析において非常に重要である、なぜならこの測定は代謝性疾患の治療モニターなどに使用できるからである。従って、唯一つのセンサーを必要とするだけであるから、迅速かつ費用のかからない試験を行うのに有利である。結果として分析装置もまたより容易に小型化できる。

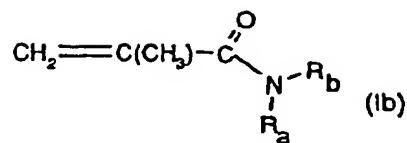
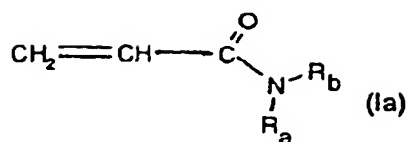
蛍光色素はこのポリマーマトリックスにより試料溶液による損傷または干渉影響から効果的に保護されているので、これらのセンサーの保存寿命および使用寿命は長い。このようなセンサーでは感度は低減せず、応答時間は驚くほど短い。

このポリマー組成物を用いて、マトリックスの、例えば親水性特性、疎水性特性、極性および/または誘電率を非常に正確に決めることが可能であり、これは選択した濃度範囲の発蛍光団と組み合わされており、その結果、特定のpH値範囲内での測定がイオン強度非依存的となる。

応答時間および調整時間は、発蛍光団(fluorophore)の埋め込みにかかわりなく、光学的測定システムに必要とされる短い時間に対応し、これらのパラメーターは実質的に膜の厚さに依存している。

本発明は、

- a) 39.9~60重量%のN,N-ジメチルアクリルアミドまたはN,N-ジメチルメタクリルアミド;
- b) 60~39.9重量%の式IaまたはIb



[式中、 R_a は水素または C_1-C_6 アルキルであり、 R_b は C_1-C_{12} アルキルである]

で示されるモノマー；

c) ポリマーと混合されているか、または共有結合している0.1～0.7重量%のプロトン感受性発蛍光団；および

d) 0～20重量%のジオレフィン性架橋成分〔a)～d)の重量%の合計が100%である〕からなる水不溶性コポリマーに関する。

本発明の範囲内において、「水不溶性」は多くて0.1%以下の量が溶解し得ることを示す。一方、試験液と良好に接触させるために、コポリマーはいずれにしても湿潤可能でなければならない。

アルキル基は直鎖または分枝鎖であり得る。 C_1-C_{12} アルキルの例は直鎖または分枝鎖基である：メチル、エチル、およびプロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ウンデシルまたはドデシルの種々の位置異性体。

モノマーa)として好ましく使用されているモノマーは、N,N-ジメチルアクリルアミドである。

好ましい水不溶性コポリマーは、 R_a が水素であり、 R_b が分枝 C_3-C_8 アルキルである場合に得られる。特に好ましいものは、 R_a が水素であり、 R_b が3級ブチルであり、モノマーa)とモノマーb)の比が50重量部対50重量部である水不溶性コポリマーである。

別の群の好ましい水不溶性コポリマーは、 R_a がメチルまたはエチルであり、 R_b が直鎖 C_3-C_8 アルキルである場合に得られる。特に好ましくは、 R_a がメチルであり、 R_b がn-ブチルである。

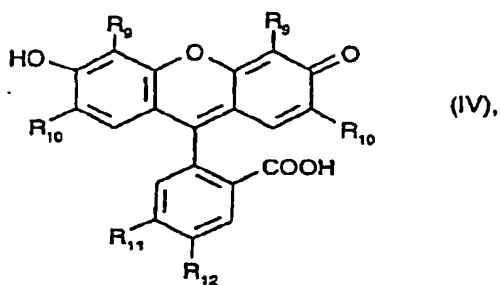
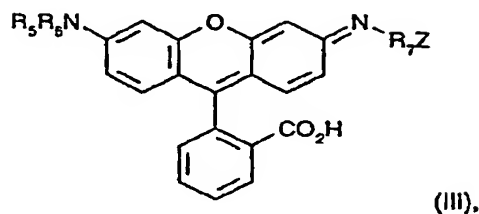
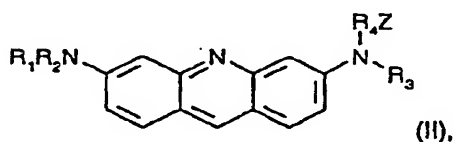
適当なプロトン感受性蛍光色素は、例えば、キサンテンおよびベンゾキサンテン群由来であり、例えば、フルオレセイン、ハロゲン化フルオレセイン、セミナ

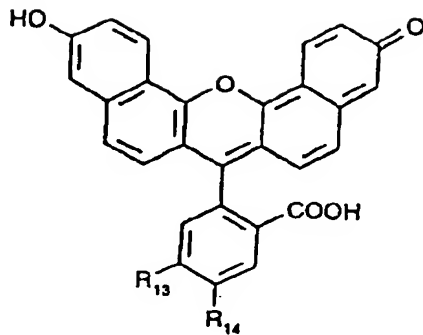
フトフルオレsein、セミナフトローダフルオル、2,3-ベンゾフルオレsein、3,4-ベンゾフルオレsein、ベンゾローダミンおよび置換誘導体の異性体、ベンゾクロモゲンおよび置換誘導体の異性体；例えばアクリジン、9-アミノ-6-クロロアクリジンなどのアクリジン；例えば7-ヒドロキシアクリドンおよび7-ヒドロキシベンズアクリドンなどのアクリドン；例えば8-ヒドロキシピレン-1,3,6-トリスルホン酸などのピレン；シアニン色素；および例えば7-ヒドロキシクマリンおよび4-クロロメチル-7-ヒドロキシクマリンなどのクマリンである。蛍光色素はポリマー骨格に結合するためにオレフィンの不飽和な基と官能基化し得る。

好ましくは、発蛍光団は、ポリマーと混合されているか、または共有結合しているアクリジン、アクリドン、ローダミン、キサンテン、ベンゾキサンテン、ピレンおよびクマリンからなる群から選択される。

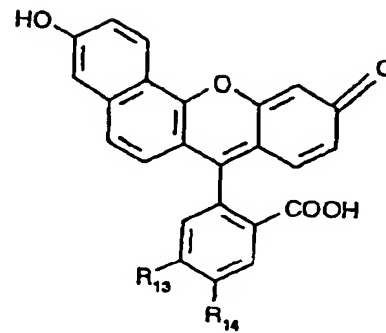
好ましくは、発蛍光団がポリマーに共有結合している水不溶性コポリマーである。

特に好ましくは、発蛍光団が式II、III、IV、VまたはVI





(V),



(VI),

〔式中、

R_1 、 R_2 、 R_5 および R_6 は、各々独立して、水素、 $-SO_2-(C_1-C_6)$ アルキルフェニル、 C_1-C_{30} アルキル、 C_1-C_{30} アルキル-CO-または式 $(C_nH_{2n}-O)_m-R_8$ で示される基であり；

R_3 は水素または $-SO_2-(C_1-C_6)$ アルキルフェニルであり；

R_4 および R_7 は C_1-C_{30} アルキレンまたは式 $(C_nH_{2n}-O)_m-R_8$ で示される基であり；

Z は二価の基 $-NH-CO-$ であり；

R_8 は直接の結合または C_1-C_{12} アルキレンであり；

n は2～6までの整数であり、 m は1～10までの整数であり、ただし、全炭素原子数は30以下である；

R_9 および R_{10} は、各々独立して、H、 C_1-C_4 アルキル、 C_1-C_4 アルコキシ、 C_1-C_4 アルコキシ-カルボニル、 C_1-C_4 アルキル- SO_2 -またはハロゲンであり、

R_{11} はHであり、 R_{12} は二価の基 $-NH-CO-$ 、 $-CO-NH(C_2-C_{12}$ アルキレン-O)-CO-、 $-CO-NH-(C_2-C_{12}$ アルキレン-NH)-CO-または $-C(O)-NH-(CH_2CH_2-O)_{1-6}-CH_2C(O)-NH-$ であるか、または R_{11} は二価の基 $-NH-CO-$ 、 $-CO-NH-(C_2-C_{12}$ アルキレン-O)-CO-、 $-CO-NH-(C_2-C_{12}$ アルキレン-NH)-CO-または $-C(O)-NH-(CH_2CH_2-O)_{1-6}-CH_2C(O)-NH-$ であり、 R_{12} はHであるか；または、

R_{13} はHであり、 R_{14} は二価の基 $-NH-C(O)-$ 、 $-CO-NH-(C_2-C_{12}$

アルキレン-O)-CO-, -CO-NH-(C₂-C₁₂ アルキレン-NH)-CO-
 -または-C(O)-NH-(CH₂CH₂-O)_{1~6}-CH₂C(O)-NH-である
 か、またはR₁₃は二価の基-NH-C(O)-, -CO-NH-(C₂-C₁₂ アルキレン-O)-CO-, -CO-NH-(C₂-C₁₂ アルキレン-NH)-CO-または-C(O)-NH-(CH₂CH₂-O)_{1~6}-CH₂C(O)-NH-であり、R₁₄はH(ただし-COOH基は各々遊離形または塩の形である)またはそのC₁-C₂₀ アルキルエステルである)]

で示される化合物である水不溶性コポリマーである。

アルキルそれ自体または例えばアルコキシおよびアルコシカルボニルなどの他の基の構成成分としてのアルキルは、各場合におけるそれぞれの炭素原子数を考慮して、直鎖(すなわち、メチル、エチル、プロピルまたはブチル)または分枝(例えばイソプロピル、イソブチル、sec-ブチルまたはtert-ブチル)の対応する基または化合物に含まれる。

ハロゲンは、フッ素、塩素、臭素またはヨウ素、特にフッ素、塩素または臭素であり、とりわけ塩素または臭素である。

二価基であるZ、R₁₁、R₁₂、R₁₃およびR₁₄が生成する例は、アクリロイルアミン基-NHCOCH=CH₂、メタクリロイルアミン基-NHCOCH(CH₃)=CH₂、および2-(メタクリロイルオキシ)-エチルアミノカルボニル基-C(=O)NHCH₂CH₂OCOC(CH₃)=CH₂である。

好ましくは、式IIの発蛍光団のR₁およびR₂は、各々独立して、水素または直鎖C₁₂-C₂₄ アルキルである。

また、好ましくは、式IIの発蛍光団のR₄は直鎖C₂-C₁₆ アルキレンか、または式-(C₂H₄-O)_n-R₈(式中、R₈およびnは前記で定義した通りである)で示される基である。

別の群の好ましい水不溶性コポリマーは、式IIIの発蛍光団のR₅およびR₆が、各々独立して、直鎖C₂-C₁₂ アルキルであるものにより形成される。

共重合し得る蛍光色素は、例えば、直接または架橋基を介して蛍光色素に結合しているエチレン的に不飽和な基(ビニル、クロトニル、メタリル)を含む。モ

ノマー a) および b) は既知である。既知の共重合し得る蛍光色素は、例えば、3-または4-アクリロイルアミノフルオレセインである。

架橋基- $\text{O}-\text{C}(\text{O})-$ および $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{C}_2-\text{C}_{12}$ アルキレン- $\text{O}-\text{C}(\text{O})-$ を含む蛍光色素をもつポリマーは、例えば、カルボキシルまたはヒドロキシル基を含む蛍光色素でエステル化することにより得られる。架橋基- $\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-$ および $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{C}_2-\text{C}_{12}$ アルキレン- $\text{O}-\text{C}(\text{O})-$ を含む蛍光色素をもつポリマーは、例えば、イソシアナート官能基化した蛍光色素およびヒドロキシル基含有ポリマーにより得ることが可能である。

上記の反応は、既知方法、例えば、適当な溶媒の非存在下または存在下、必要であれば冷却して、室温で、または加熱して、例えば約5℃～約200℃の温度範囲で、好ましくは約20℃～120℃で、必要であれば、密閉容器で、加圧下で、不活性ガス雰囲気下、および/または無水条件下で行い得る。

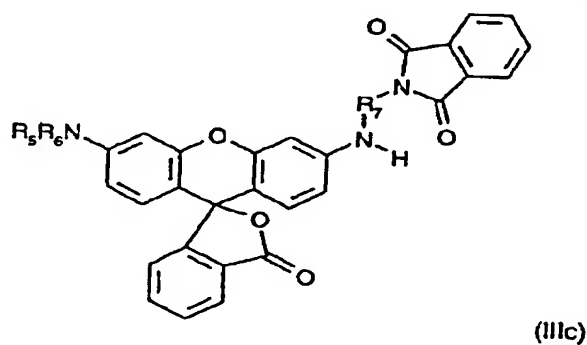
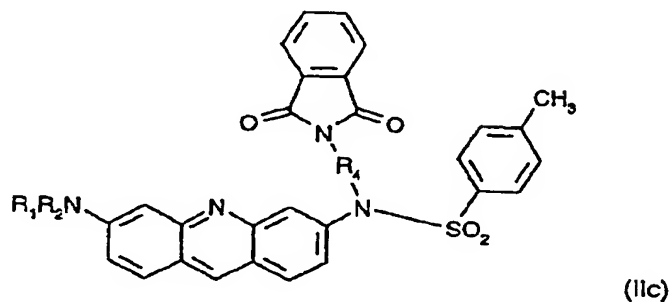
ポリマーの調製は既知方法に従って行い得る。

反応物はそれ自体を互いに、すなわち、溶媒または希釈剤を添加せずに、例えば溶融して反応させ得る。しかしながら、一般的に、溶媒または希釈剤または溶媒混合物の添加が良好である。このような溶媒および希釈剤の例として：水；例えば酢酸エチルなどのエステル；例えばジエチルエーテル、ジプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジブチルエーテル、tert-ブチルメチルエーテル、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノエチルエーテル、エチレングリコールジメチルエーテル、ジメトキシジエチルエーテル、テトラヒドロフランまたはジオキサンなどのエーテル；例えば、アセトン、メチルエチルケトンまたはメチルイソブチルケトンなどのケトン；例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、エチレングリコールまたはグリセロールなどのアルコール；例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジエチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンまたはヘキサメチルリン酸トリアミドなどのアミド；例えば、アセトニトリルまたはプロピオニトリルなどのニトリル；および例えば、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシドがあり得る。

共重合し得る蛍光色素は、既知方法に従って製造し得、出発原料は市販されているか、または類似方法に従って製造できる。

式IIまたはIIIで示される化合物の1つの可能な製造法は、

a) 式IIcまたはIIId



で示される化合物において、酸性条件下でフタルイミド基を除去し、適当な場合には、第2段階で

b) さらに反応生成物を塩化アクリル酸または塩化メタクリル酸と反応させ、または

c) 適当な場合には、酸性条件下で式IIcの出発原料の反応生成物からパラートルエンシルホニル基を除去する (R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_5 、 R_6 および R_7 基は前記で定義した通りである) ことを含む。

保護基を除去する方法は既知であり、式IIおよびIIIで示される化合物の製造には類似の方法を使用し得る。

式IIcで示される化合物は、異なるアルキル化剤を用いた段階的なアルキル化、またはアルキル化剤または市販の3,6-ジアミノアクリジンというアシル化剤でのアルキル化といった既知方法で製造し得る。適当なアルキル化剤は、例え

ば、ジアルキル硫酸塩またはモノハロアルカン、特にクロロー、ブローモおよびヨード

アルカンである。適当なアシル化剤は、例えば、カルボン酸無水物および、特に、例えば塩化カルボン酸などのハロゲン化カルボン酸である。その反応は、例えばエーテル、アルキル化酸アミドおよびラクタムまたはスルホンなどの不活性な極性および非プロトン性溶媒の存在下、例えば50～150℃といった高温で行い得る。便宜には、例えばアルカリ金属炭酸塩または3級アミン、特に立体的に込み合った3級アミンなどのハロゲン化水素受容体を加える。

式IIIcで示される化合物は、例えば、フタル酸無水物を2モル当量の3-モノアルキルアミノフェノールと反応させることにより得られる。別の可能な製造法は、3-モノアルキルアミノフェノールと1モル当量の2-ヒドロキシ-4-ジアルキルアミノ-2'-カルボキシベンゾフェノンとの反応である。これらの反応は、例えばUS-A-4 622 400に記載されている。

式IV、VおよびVIで示される化合物は、類似の方法で製造し得る。

反応条件はそれ自体既知である。それらは、例えば、適当な溶媒または希釈剤またはそれらの混合物の存在下、必要であれば冷却しながら、室温で、または加熱しながら、例えば約-10℃から反応混合物の沸点の温度範囲で、好ましくは約0℃から約25℃で、必要であれば、密閉した容器で、加圧下、不活性ガス雰囲気下および/または無水条件下で行い得る。特に有利な反応条件は、実施例に開示する。

好ましくは、コポリマーの平均分子量は2000～500000、特に10000～350000ダルトンであり、これは分子量が既知の標準的なポリマーを用いたゲル浸透法に従って測定した。

水不溶性のコポリマーは層の形で、例えば0.01～20重量%、好ましくは0.1～10重量%、特に好ましくは0.5～5重量%の、ポリマーを基本とした架橋剤を用いて架橋し得る。適当な架橋剤は、例えばアクリル酸またはメタクリル酸エステルまたはポリオールアミド、好ましくはジオールからテトラール、またはポリアミン、好ましくはジアミンからテトラミンである。このような架橋剤

は既知であり、文献に広く記載されている。ポリオールの場合は、エチレングリコール、1,3-プロパンジオール、1,4-ブタンジオール、1,6-ヘキサンジ

オール、ジエチレングリコール、1,1,1-トリヒドロキシメチルエタンまたはプロパン、ペンタエリトリールおよびジペンタエリトリールである。ポリアミンの例は、エチレンジアミン、1,3-プロパンジアミン、1,4-ブタンジアミン、1,6-ヘキサレンジアミン、ジエチレントリアミンおよびトリエチレントラミンである。他の既知の架橋剤は、例えば、ジビニルベンゼンである。例えば、アルキレン-ビス-ジアルキルマレイミジル化合物は、例えばエチレン-ビス-(ジメチル)マレイミジルにも適当である。

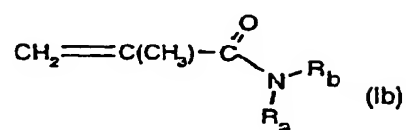
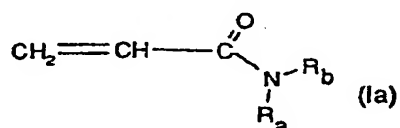
本発明は、

A) 透明支持体

B) 水不溶性コポリマーの層【これは

a) 39.9～60重量%のN,N-ジメチルアクリルアミドまたはN,N-ジメチルメタクリルアミド；

b) 60～39.9重量%の式IaまたはIb



【式中、R_aは水素またはC₁-C₆アルキルであり、R_bはC₁-C₁₂アルキルである】

で示されるモノマー；

c) ポリマーと混合されているか、または共有結合している0.1～0.7重量%のプロトン感受性発蛍光団；および

d) 0～20重量%のジオレフィン性架橋成分【a)～d)の重量%の合計は100%である】からなる組成物およびイオン強度非依存性pH値測定用の光センサーに関するものでもある。

好ましい上記のコポリマーおよび蛍光色素は、同様にセンサーに適用する。

発蛍光団をポリマーと混合したセンサーは、原則的に一度きりの使用に適している。ポリマー膜に浸透性で親水性の保護層を施すのであれば、これらのセンサーおよび、また、一般的に、ポリマー結合発蛍光団のついたセンサーであって膜上に保護層を持つものは、反復して、または連続測定に使用し得る。

支持体の幾何学形は幅広く変化し得る；それは、例えば繊維状、柱状、球状、立方形または正六面体であり得る。さらに、継続測定または連続測定を行うフローシステムが可能である。平面センサーが好ましい。支持体は透明である。それは例えば、ポリカーボネート、ポリエステル(例えばポリエチレンテレフタレート)、ポリアミド、またはポリアクリル酸またはポリメタクリル酸などの無機ガラスまたは透明プラスチックであり得る。

平面センサーは、例えば四角、方形または球形などのあらゆる外形であり得る。表面積が $0.01 \sim 約50 \text{ cm}^2$ 、より有利には $0.02 \sim 10 \text{ cm}^2$ であり得る。センサーの測定面は表面積が 5 mm^2 以下であり、好ましくは 2 mm^2 か、それ以下であり得る。測定面はセンサーの完全に被覆された表面の一方に正確に一致する。有利には、両面にあるが部分的に分離している被覆を使用し得る。

センサーは1つまたはそれ以上の部分的に分離した膜層を含み得る；後者の場合、平行測定を、同一または異なる試験試料を用いて行い得る。

好ましくはポリマー層B)の厚さは $0.1 \sim 500 \mu\text{m}$ 、特に好ましくは $1 \sim 100 \mu\text{m}$ である。

このような層の製造は、例えば有機溶媒に組成物を溶解し、次いで型をとり薄膜を形成し、最後に溶媒を除去するといったそれ自体既知の方法でなし得る。

層の製造に可能な別の方法は、被覆技術で既知の工程である。例は、スピン被覆、噴霧またはナイフ適用法であり、スピнкаースティング法が好ましい。適当な溶媒は、アルコール、エーテル、エステル、酸アミドおよびケトンを含む。特に適当なものは易揮発性溶媒、特にテトラヒドロフランである。

まず最初に組成物を溶解し、成形し、続いて溶媒を再び蒸発させるというこれらの工程に加えて、組成物が熱可塑性物質であるので、熱成形工程も可能である。適当な工程には、熱可塑性プラスチック工程で既知の押出し、射出成形、圧縮

または吹込み工程を含む。

層は透明またはわずかに不透明である。好ましくは透明である。

接着を改善するために、支持体を接着促進剤で事前に処理し得る。同目的のため

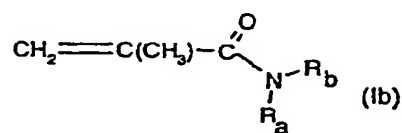
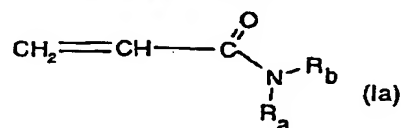
めに、表面上に官能基を作製するために支持体をプラズマ処理することも可能である。接着を特に良くするために共重合可能な基を表面に施すことも可能である。既知のガラスの接着促進剤は、例えばトリエトキシグリシジルオキシシラン、3-アジドプロピルトリエトキシシランおよび3-アミノプロピルトリエトキシシランである。このように処理した表面は、例えばO-(N-スクシニミジル)-6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)-ヘキサ酸塩を用いてさらに修飾し得る。

本発明は、また、A) 透明支持体

B) 水不溶性コポリマーの層 [これは

a) 39.9~60重量%のN,N-ジメチルアクリルアミドまたはN,N-ジメチルメタクリルアミド;

b) 60~39.9重量%の式IaまたはIb



[式中、R_aは水素またはC₁-C₆アルキルであり、R_bはC₁-C₁₂アルキルである]

で示されるモノマー;

c) ポリマーと混合されているか、または共有結合している0.1~0.7重量%のプロトン感受性発蛍光団; および

d) 0~20重量%のジオレフィン性架橋成分 [a)~d)の重量%の合計は100%である] からなる光センサーを水性試験試料と接触させ、励起光で照射し、蛍光を測定し、検量線を利用して測定した蛍光強度からpH値を計算する、蛍光法による水性試料のイオン強度非依存性、可逆光学的pH値測定法

にも関する。

コポリマーおよび蛍光色素に関する上記の好ましい事項は同様にセンサーに適用する。

詳細な実験方法は以下の通りである：既知 pH の試料で検量線を作成した後、

未知の組成物の試験溶液に接触している蛍光強度を測定し、測定した蛍光強度に関する pH を検量線から直接に決定する。

センサーを検量用溶液および試験試料と接触させる。これは手で（例えばピペッティングにより）または適当な自動フローシステムを用いてなし得、センサーはフローセルの定位位置に取り付け得る。このようなフローセルは当業者には既知であり、当面の目的に簡単な方法で適用し得る。

UV ランプ（例えば水銀蒸気ランプ、ハロゲンランプ）、レーザー、ダイオードレーザーおよび発光ダイオードは、蛍光の励起用の光源として使用し得る。フィルターを用いて、蛍光色素が最大吸収をもつ波長の光を選別することが便宜であり得る。センサーにより発光された蛍光は、例えばレンズ系を用いて回収でき、次いで、例えば 2 次電子増幅器またはホトダイオードなどの検出器に伝える。レンズシステムはまた、蛍光照射が支持体の端または解析試料を介して、透明支持体を通して測定されるように調節されている。有利には、照射は二色性鏡を用いたそれ自体既知の方法で屈折させる。センサーの蛍光は、好ましくは、検量線用溶液または試料溶液と接触している間に測定する。

測定は、連続照射を用いて光定常的な条件下で行い得るが、必要であれば、時間刻みにできる。これは、例えば、持続の限られたレーザーパルスまたは光源強度の調節によりなし得る。

応答時間は 30 秒以内であり得、最初の測定は約 5 分以下の後にすでに可能である。センサーは高い貯蔵安定性により、さらに特徴づけられる。

好ましくは、工程には pH が 6.5 ~ 8.5、特に好ましくは pH 値が 6.7 ~ 7.8 の試験溶液を使用する。

試験溶液のイオン強度は、好ましくは 0.05 ~ 5 モル/l、特に好ましくは 0.05 ~ 1 モル/l である。

試験溶液は、無機または有機酸の塩を含み得る。例は、クエン酸、乳酸または酢酸の塩、またはリン酸、塩酸および硫酸の塩、または炭酸塩である。

好ましくは、試験溶液は実質的に1,1-または1,2-塩を含む。1,1-塩の例は、 LiCl 、 NaCl 、 KCl および NH_4Cl である。1,2-塩の例は、例え

ばG. Kortum、Lehrbuch der Elektrochemie、第4版、Verlag Chemie 1966、156

ページに記載したように、 CaCl_2 、 MgCl_2 および K_2SO_4 である。

好ましくは、試験溶液は部分的または全体的に体液からなる。特に好ましくはそれらは部分的または全体的に血液からなる。

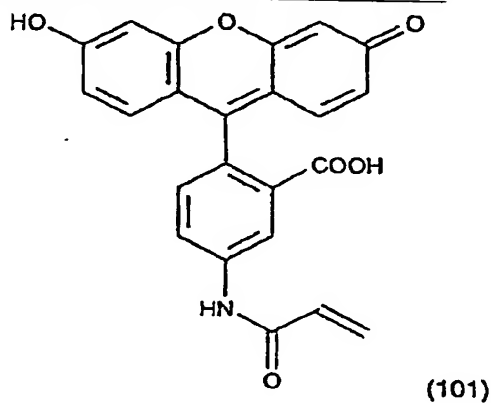
測定は単一の測定として、または連続的に行い得る。

本発明は、蛍光法による水性試験溶液のpH値のイオン強度非依存的な光学測定のための、上記の光センサーの使用に関する。

下記の実施例は本発明を説明する。

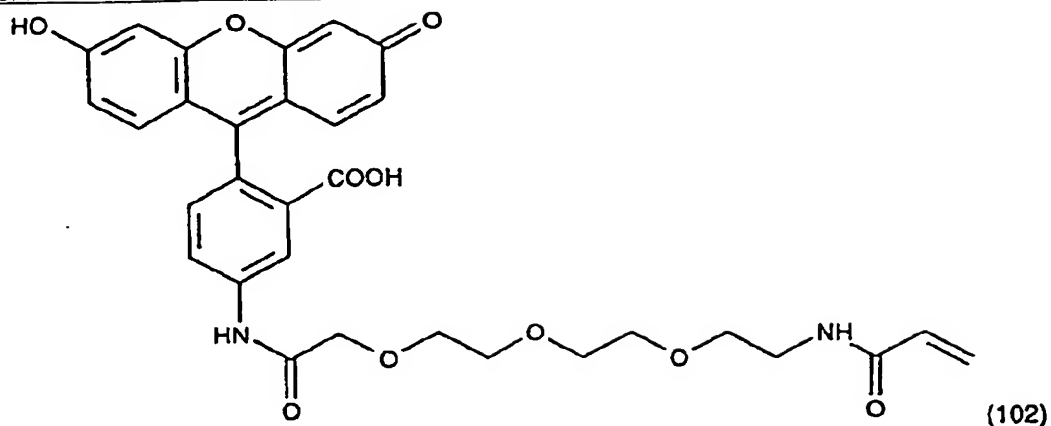
実施例A 官能基化蛍光色素の調製

実施例A1 4-アクリロイルアミドフルオレセイン(101)の製造

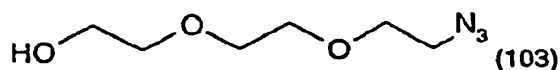


4-アミノフルオレセイン5gをアセトン200mlに懸濁し、10分間かけて塩化アクリロイル1.4mlのアセトン2ml溶液を滴下して加える。懸濁液を室温で3時間攪拌する。結晶を濾別し、アセトンおよびエーテルで洗浄し、乾燥させる。融点 $>200^\circ\text{C}$ をもつ化合物(101)5.7gが得られる。質量分析-FD: 402。

実施例 A 2 化合物 (102) の製造

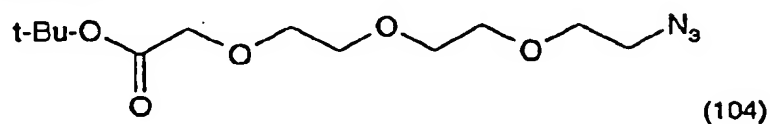


a)



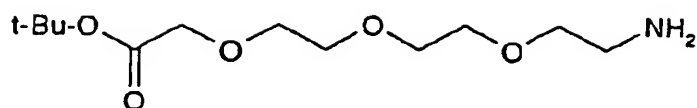
トリエチレングリコールモノクロロヒドリン 2.9 ml およびアジ化ナトリウム 2.0 g を溶媒なしで 110℃ で一晩攪拌する。反応混合物をエーテルで希釈し、濾別する。溶媒を蒸発させ、濾液を 110-115℃ の高真空下で濃縮する。化合物 103 が 86% の収率で得られる。

b)



7 NaH (ペンタンで洗浄する) 8.2 g を乾燥テトラヒドロフラン 150 ml に懸濁する。化合物 (103) 3.0 g を 5℃ で滴下して加える。混合物をさらに 30 分間攪拌し、続いて α -ブromo酢酸 tert-ブチルエステル 3.8 ml のテトラヒドロフラン 60 ml 溶液と反応させる。混合物を一晩攪拌し、エーテルを蒸発させ、有機層を水で 3 回および塩溶液で 1 回洗浄し、乾燥させる。残った油状物を 140℃ から 150℃ の高真空下で蒸留する。化合物 (104) が得られる。高速原子衝撃質量分析: 290 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (CDCl₃): 1.45 ppm (9H, s, t-Bu); 4.03 (2H, s, OCH₂COO)。

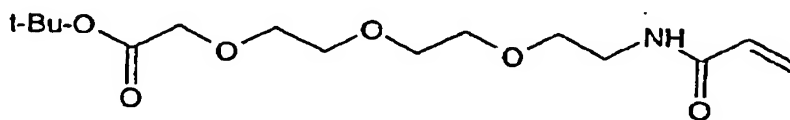
c)



(105)

化合物(104)のアジド基を水素で定量的に還元し、触媒として5% Pd/Cおよび溶媒として1,4-ジオキサンを使用する。化合物(105)が得られる。¹H-NMR(CDCl₃): 1.45 ppm(9H, s, t-Bu); 2.2(2H, ブロード, NH₂); 2.9(2H, t, J = 6 Hz, CH₂N); 4.03(2H, s, OCH₂COO)。

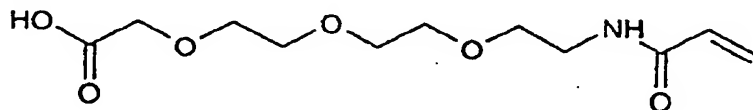
d)



(106)

化合物(105)をCH₂Cl₂に溶解し、0℃で1.5当量のNEt₃および1.5当量の塩化アクリロイルで処理する。透明な溶液を5時間攪拌し、次いで水、塩溶液および水で洗浄する。有機層を乾燥させる。残った油状物を溶出液としてCH₂Cl₂を用いてシリカゲルクロマトグラフィーで精製する。収率は化合物(106)が74%である。¹H-NMR(CDCl₃): 1.45 ppm(9H, s, t-Bu); 4.03(2H, s, OCH₂COO); 5.10(1H, m, CH=C); 6.05-6.35(2H, m, C=CH₂)。

e)



(107)

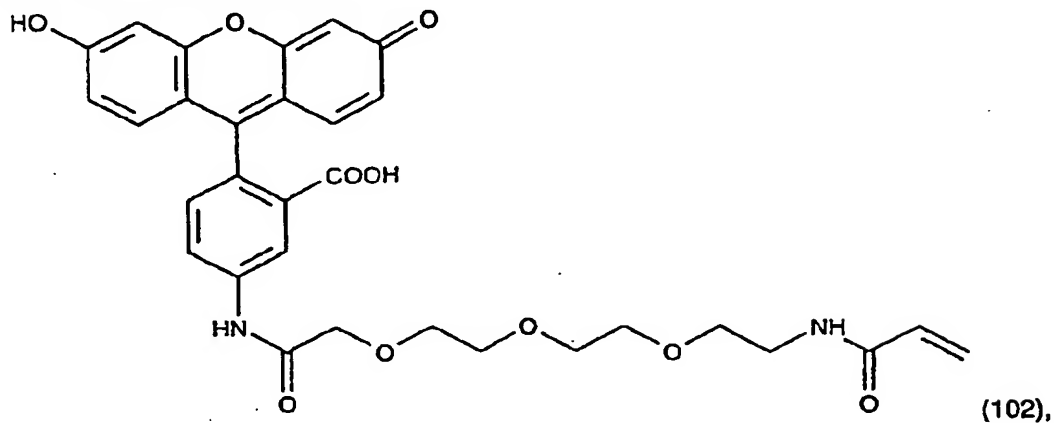
化合物(106)のtert-ブチルエステルを6時間かけて室温でトリフルオロ酢酸およびCH₂Cl₂の1:1混合物を用いて除去する。反応生成物(107)を精製せずに次の段階に直接使用する。

f) 酸(107)を室温で3時間テトラヒドロフラン中で1当量のカルボニルジイミダゾールで処理する。テトラヒドロフラン中の0.9当量の4-アミノフ

ルオレセインをその溶液に加え、混合物を室温で72時間攪拌する。反応混合物を乾燥させ、生成物を溶出液としてMeOH/CH₂Cl₂を用いてシリカゲルクロ

マトグラフィーで精製する。205℃（分解）の融点をもつ橙色の結晶の化合物

(102) が37%の収率で得られる。



高速原子衝撃質量分析：591 [M+H]⁺、613 [M+Na]⁺、629 [M+K]⁺

。

B) コポリマーの製造

実施例B1。真空および窒素に接続されている三方栓のついたアンプルにおいて、N,Nジメチルアクリルアミド2.19g(22.1mmol)、N-tert-ブチルアクリルアミド2.81g(22.1mmol)、4-アクリロイルアミドフルオレセイン200mg（実施例A1由来の化合物101）およびアゾビスイソブチロニトリル25mgをジメチルスルホキシド15mlに溶解する。アンプル中の空気は、3回行う冷凍／解凍サイクルにより窒素で置換する。アンプルを水浴中で2日間60℃に維持する。アンプルの粘性含有物を温メタノール100mlで希釈し、コポリマーを攪拌しながら水2lに注意深く滴下して注ぐことにより沈殿させる。コポリマーを濾過し、粗く乾燥させる。沈殿を2回以上反復する。このように精製した最終生成物を60°の高真空下で乾燥させる。収率：3.6gまたは理論収率69%、ガラス転移点T_g=156℃、N-tert-ブチルアクリルアミドの含量=45.7重量%（IR分光計で測定）、25℃におけるクロロホルム0.5%溶液の固相粘度η_{inh}=1.07dl/g。

実施例B2. 実施例A1の蛍光色素(101)125mgを加えること以外は実施例B1と方法は同じである。以下の特徴をもつコポリマーが得られる。収率4.4gまたは理論収率86%、 $T_g = 152^\circ\text{C}$ 、N-tert-ブチルアクリルアミドの含量=54.2重量%(IR分光計で測定)、25℃におけるクロロホルム0.5%溶液の固有粘度 $\eta_{inh} = 1.39\text{ dl/g}$ 、UV分光計で測定した色素含有量=2.2重量%。

実施例B3. 実施例A1の蛍光色素(101)15mgを加えること以外は実施例B1と方法は同じである。以下の特徴をもつコポリマーが得られる。収率3.4gまたは理論収率68%、 $T_g = 149^\circ\text{C}$ 、N-tert-ブチルアクリルアミド=58.7重量%(IR分光計で測定)、25℃におけるクロロホルム0.5%溶液の固有粘度 $\eta_{inh} = 1.68\text{ dl/g}$ 、UN分光計で測定した色素含有量=0.26重量%。

実施例B4. 真空および窒素に接続されている三方栓のついたアンプルにおいて、N,Nジメチルアクリルアミド2.19g(22.1mmol)、N-tert-ブチルアクリルアミド2.81g(22.1mmol)、実施例A2の化合物102 35mgおよびアゾビスイソブチロニトリル25mgをジメチルスルホキシド15ml中に溶解する。アンプル中の空気は3回行なう冷凍/解凍サイクルにより窒素で置換する。アンプルを水浴中で5日間60℃に維持する。アンプルの粘性含有物を温メタノール25mlで希釈し、コポリマーを攪拌しながらエーテル1.5lに注意深く滴下して注ぐことにより沈殿させる。コポリマーを濾過し、粗く乾燥させる。沈殿を2回以上反復する。このように精製した最終生成物を50°の高真空下で2日間乾燥させる。収率:4.05gまたは理論収率81%、ガラス転移点 $T_g = 151^\circ\text{C}$ 、N-tert-ブチルアクリルアミドの含有量=51.9重量%(IR分光計で測定)、25℃におけるテトラヒドロフラン0.5%溶液の固有粘度 $\eta_{inh} = 1.34\text{ dl/g}$ 、UV分光計で測定した色素含有量=0.44%。

実施例B5 N,N-ジメチルアクリルアミド2.31g(23.29mmol)、N-メチル-N-ブチルアクリルアミド2.69g(19.06mmol)および実施例A1の蛍光色素(101)35mgを加える以外は、実施例B4と方法は同じである

。以下の特徴をもつコポリマーが得られる。収率3.72gまたは理論収率74%、 $T_g = 90^\circ\text{C}$ 、N,N-ジメチルアクリルアミドの含有量=55.7mol%(1R分

光計で測定)、 25°C におけるクロロホルム0.5%溶液の固有粘度 $\eta_{inh} = 1.17\text{ dl/g}$ 、UV分光計で測定した色素含有量=0.62重量%。

C センサーの製造

実施例C1

ガラス物質(18mmの直径のプレート)をまず最初に30%水酸化ナトリウム溶液中で洗浄にし、次いで65%硝酸で活性化する。次いで活性化されたプレートを3-アミノプロピルトリメトキシシランでシラン化する。シラン化したプレートを、ジメチルホルムアミド/ホウ砂緩衝液(5:1)中のO-(N-スクシンイミジル)-6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)-ヘキサン酸塩の溶液中、室温で1時間反応させる。実施例B1のポリマー(5%)を 20° から 25° でメタノール中に溶解し、20秒間500回転/分のスピードでスピンドットすることにより薄膜の形でアジド基で官能基化したプレート上に適用し、15分間照射し、次いで窒素雰囲気下 60° で12時間乾燥させる。膜の層の厚さは約1 μm である。

実施例C2～C5。実施例C1と方法は同じであり、実施例B2～B5の対応するポリマーを使用する。

D 適用実施例

一般的な方法

センサーをフローセルに取り付ける。検量線用溶液および試料溶液をポンプで計量し、セルを通して移動させる。測定調整はサーモスタットで制御する。ハロゲンランプの光(白色光、励起波長480nm)を励起フィルターを通して伝え、二色性鏡に反射させ、レンズにより平面センサーの上に焦点をあてた。センサー(520nm)により放出される蛍光を同じレンズシステムで集め、発光フィルターおよび二色性鏡を用いてフォトダイオードに向ける。検量線用溶液と試料溶液にセンサーが作用している間に、センサーの蛍光を記録する。pH値は測定値

から直接に測定し得る。

下記の表1は、異なる膜の組成物を基礎として、pH範囲が6.7～8.0における電解質のイオン強度のpH依存性を説明する。

表1

実施例のセンサー	色素の量	イオン強度0.1モル/lでのpK。	0.1および0.3モル/lでのイオン強度依存性
C1比較試験	4重量%	測定不可能	非常に高い(>1) ¹
C2比較試験	2.2重量%	7.3	高い(1) ¹
C3	0.26重量%	7.3	非依存性(0) ¹
C4	0.44重量%	7.3	非依存性(0) ¹
C5	0.62重量%	7.5	非依存性(0) ¹

¹数値はpK。値間の差に関するものであり、これはイオン強度0.1モル/lで

1回、イオン強度0.3モル/lで1回測定した。

[国際調査報告]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 96/04426

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/84 G01N21/64 C08F220/56

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N C08F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A, P	WO, A, 95 30148 (CIBA GEIGY AG ; ALDER ALEX (CH); BARNARD STEVEN (CH); BERGER JOSEPH) 9 November 1995 see the whole document ---	1-21
A	US, A, 4 906 249 (FOGT ERIC ET AL) 6 March 1990 see column 1, line 33 - line 40 ---	1-21
A	WO, A, 94 28786 (OPTICAL SENSORS INC) 22 December 1994 see the whole document ---	1-21
A	US, A, 5 354 825 (KLAINER STANLEY M ET AL) 11 October 1994 see column 7; example 7 ---	1-21
- / - -		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 February 1997

Date of mailing of the international search report

26 -02- 1997

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5118 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wells, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/EP 96/04426

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US,A,5 273 716 (NORTHROP M ALLEN ET AL) 28 December 1993 see claim 1 ----	1-21
A	US,A,5 132 057 (TOMISAKA DENNIS M ET AL) 21 July 1992 see column 3 - column 4 ----	1-21
A	US,A,4 898 691 (BORZO MARIE ET AL) 6 February 1990 see column 5; example 5 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 96/04426

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9530148	09-11-95	AU-A- 2222395 AU-A- 2222495 CA-A- 2186620 CA-A- 2187365 WO-A- 9529959	29-11-95 29-11-95 09-11-95 09-11-95 09-11-95
US-A-4906249	06-03-90	NONE	
WO-A-9428786	22-12-94	AU-A- 7098894 EP-A- 0703750 US-A- 5536783	03-01-95 03-04-96 16-07-96
US-A-5354825	11-10-94	US-A- 5480723 WO-A- 8805533 EP-A- 0205232 JP-A- 61258201	02-01-96 28-07-88 17-12-86 15-11-86
US-A-5273716	28-12-93	NONE	
US-A-5132057	21-07-92	US-A- 5056520 CA-A- 2065452 EP-A- 0495801 JP-T- 5501207 WO-A- 9105513	15-10-91 12-04-91 29-07-92 11-03-93 02-05-91
US-A-4898691	06-02-90	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

G 0 1 N 33/84

G 0 1 N 33/84

A

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN

(72)発明者 ルイリー, マリツェル

スイス、ツェーハー5073ギブフーオーバー
フリック、ミュリガス7番

(72)発明者 バルドナー、アドリアン

スイス、ツェーハー4123アルシュビル、
ホレーベーク39番